

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

中内啓光

1. Onozuka I, Kakinuma S, Kamiya A, Miyoshi M, Sakamoto N, Kiyohashi K, Watanabe T, Funaoka Y, Ueyama M, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Feb 12. [Epub ahead of print]
2. Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011, 8(2): 177-187.
3. Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol.* 2010 Dec 24. [Epub ahead of print]
4. Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M. Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem.* 2011, 286(6): 4760-4771.
5. Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS One.* 2010, 5:e14099.
6. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med.* 2010, 207(13): 2817-2830.
7. Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, Takayanagi S, Haruyama E, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nakauchi H, Nagashima H. Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 402: 14-18.
8. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell.* 2010, 142: 787-799.

9. Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in Mice. *Hepatology*. 2010, 52: 1111-1123.
10. Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H. Reprogramming adult hematopoietic cells. *Curr Opin Hematol*. 2010, 17: 271-275.
11. Mashima R, Honda K, Yang Y, Morita Y, Inoue A, Arimura S, Nishina H, Ema H, Nakauchi H, Seed B, Oda H, Yamanashi Y. Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Lab Invest*. 2010, 17: 271-275.
12. Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2010, 16: 3825-3831.
13. Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene*. 2010, 29: 4157-4169.
14. Hirabayashi M, Kato M, Sanbo M, Kobayashi T, Hochi S, Nakauchi H. Rat transgenesis via embryonic stem cells electroporated with the Kusabira-orange gene. *Mol Reprod Dev*. 2010, 77: 474.
15. Morita Y, Ema H, Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med*. 2010, 207: 1173-1182.
16. Sugawara T, Oguro H, Negishi M, Morita Y, Ichikawa H, Iseki T, Yokosuka O, Nakauchi H, Iwama A. FET family proto-oncogene Fus contributes to self-renewal of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2010, 38: 696-706. Epub 2010
17. Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle*. 2010, 9.
18. Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, Ikawa T, Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, Iwama A. Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell Stem Cell*. 2010, 6:279-286.
19. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Heissig B,

Hattori K. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood*. 2010, 115: 4302-4312.

20. Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K. Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *J Clin Invest*. 2010, 120: 179-190.
21. Liao CH, Akazawa H, Tamagawa M, Ito K, Yasuda N, Kudo Y, Yamamoto R, Ozasa Y, Fujimoto M, Wang P, Nakauchi H, Nakaya H, Komuro I. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest*. 2010, 120: 242-253.
22. Hirabayashi M, Kato M, Kobayashi T, Sanbo M, Yagi T, Hochi S, Nakauchi H. Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate in germline chimerae at high efficiency. *Mol Reprod Dev*. 2010, 77: 94. No abstract available

渡辺信和

1. Suguro H, Mikami Y, Koshi R, Ogiso B, Watanabe E, Watanabe N, Honda MJ, Komiyama K, Asano M. Novel approach for transient protein expression in primary cultures of human dental pulp-derived cells. *Protein Expr Purif*. 2011 Feb 13. [Epub ahead of print]
2. Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3(dim) CD7(low) subpopulation of CD4(+) T cells in acute-type adult T-cell leukemia. *Cancer Sci*. 2011, 102(3): 569-77.
3. Mikami Y, Senoo M, Lee M, Yamada K, Ochiai K, Honda MJ, Watanabe E, Watanabe N, Somei M, Takagi M. Inhibitory Effects of a Tryptamine Derivative on Ultraviolet Radiation-Induced Apoptosis in MC3T3-E1 Mouse Osteoblasts. *J Pharmacol Sci*. 2011, 115(2): 214-220. Epub 2011 Jan 26.
4. Yoshikazu Mikami, Yumiko Ishii, Nobukazu Watanabe, Tetsuo Shirakawa, Shinnosuke Suzuki, Seiko Irie, Keitaro Isokawa, Masaki J. Honda, CD271/p75NTR inhibites the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells and Development*, 2010 [Epub ahead of print]

5. Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Jung HS, Honda MJ, Ishii Y, Watanabe N, Ohshima H. Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries. *Histochem Cell Biol*. 134(3): 227-241, 2010.
6. Mizuno D, Agata H, Furue H, Kimura A, Narita Y, Watanabe N, Ishii Y, Ueda M, Tojo A, Kagami H., Limited but heterogeneous osteogenic response of human bone marrow mesenchymal stem cells to bone morphogenetic protein-2 and serum. *Growth Factors*, 28(1): 34-43, 2010.
7. Agata H, Asahina I, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H., Characteristic change and loss of in vivo osteogenic abilities of human bone marrow stromal cells during passage. *Tissue Eng. Part A*, 16(2): 663-73, 2010.

高橋聡

1. Nakasone H, Kanda Y, Takasaki H, Nakaseko C, Sakura T, Fujisawa S, Yokota A, Yano S, Usuki K, Maruta A, Abe D, Hoshino T, Takahashi S, Kanamori H, Okamoto S; Kanto Study Group for Cell Therapy. Prophylactic impact of imatinib administration after allogeneic stem cell transplantation on the incidence and severity of chronic graft versus host disease in patients with Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leukemia*. 24 (6): 1236-9, 2010.
2. Sato A, Ooi J, Takahashi S, Tsukada N, Kato S, Kawakita T, Yagyu T, Nagamura F, Iseki T, Tojo A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with advanced myelodysplastic syndromes. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Apr 19. [Epub ahead of print]
3. Waki F, Masuoka K, Fukuda T, Kanda Y, Nakamae M, Yakushijin K, Togami K, Nishiwaki K, Ueda Y, Kawano F, Kasai M, Nagafuji K, Hagihara M, Hatanaka K, Taniwaki M, Maeda Y, Shirafuji N, Mori T, Utsunomiya A, Eto T, Nakagawa H, Murata M, Uchida T, Iida H, Yakushiji K, Yamashita T, Wake A, Takahashi S, Takaue Y, Taniguchi S. Feasibility of Reduced-intensity Cord Blood Transplantation as Salvage Therapy for Graft Failure: Results of a Nationwide Survey of 80 Adult Patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. Sep 14. [Epub ahead of print] 2010
4. Kako S, Morita S, Sakamaki H, Ogawa H, Fukuda T, Takahashi S, Kanamori H, Onizuka M, Iwato K, Suzuki R, Atsuta Y, Kyo T, Sakura T, Jinnai I, Takeuchi J, Miyazaki Y, Miyawaki S, Ohnishi K, Naoe T, Kanda Y. A decision analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic

leukemia in first remission who have an HLA-matched sibling donor. *Leukemia*. 25:259-65, 2011

田野崎隆二

1. Fuji S, Kim SW, Mori S, Furuta K, Tanosaki R, Heike Y, Takaue Y, Fukuda T. 2010. Decreased insulin secretion in patients receiving tacrolimus as GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 45:405-406.
2. Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Tomonaga M, Harada M, Yamanaka T, Kannagi M, Okamura J. 2010. Long-term outcomes after hematopoietic SCT for adult T-cell leukemia/lymphoma: results of prospective trials. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Apr 19. [Epub ahead of print]
3. Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. 2010. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood* 116(8): 1369-76.
4. Kakugawa Y, Kami M, Matsuda T, Saito Y, Kim SW, Fukuda T, Mori S, Shimoda T, Tanosaki R, Saito D. 2010. Endoscopic diagnosis of cytomegalovirus gastritis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *World J Gastroenterol* 16(23):2907-2912.
5. Yokoyama H, Mori S, Kobayashi Y, Kurosawa S, Saito B, Fuji S, Maruyama D, Azuma T, Kim SW, Watanabe T, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y, Fukuda T. 2010. Hematopoietic stem cell transplantation for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute leukemia: a single-center analysis of 47 patients. *Int J Hematol* 92(2): 334-341.
6. Imataki O, Kamioka T, Fukuda T, Tanosaki R, Takaue Y. 2010. Cost and effectiveness of reduced-intensity and conventional allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Support Care Cancer* 18(12): 1565-1569.
7. Tanosaki R and Tobinai K. 2010. Adult T-cell leukemia-lymphoma: current treatment strategies and novel immunological approaches. *Expert Rev Hematol*. 3:743-753.

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究・医療技術実用化総合研究事業
HLAミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による
臨床診断の有用性に関するエビデンス創出
研究代表者：中内啓光

第2回 移植後キメリズム解析研究会



平成23年2月1日（火）

東京大学医科学研究所 一号館講堂

第2回 移植後キメリズム解析研究会

近年、臍帯血移植やHLA半合致移植が増え、造血細胞移植の多くがHLAミスマッチで行なわれています。ドナーとレシピエントにそれぞれ特異的なHLAを抗HLA抗体で染色し、フローサイトメーターで解析するHLA-Flow法は、移植後の生着不全や再発の早期診断に有用です。本研究会は、HLA-Flow法を造血細胞移植や臓器移植後の様々な病態の診断やメカニズムの解明に役立てることを目指しています。参加は無料で予約は不要です。みなさんの幅広い参加を歓迎します。

【日時と場所】

平成 23 年 2 月 1 日 (火)

13:00 - 17:20 講演会 (東京大学医科学研究所・1号館講堂)

17:30 - 19:30 懇親会 (東京大学医科学研究所・近代医科学記念館)

司会：高橋聡先生 (東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科)
田野崎隆二先生 (国立がんセンター中央病院 臨床検査科)

- 13:00-13:10 開会の挨拶
中内啓光先生 (幹細胞治療研究センター)
- 13:10-13:40 新規 Allele 特異的 HLA 抗体の作製を目指した試み
山崎聡研究員 (科学技術振興機構 ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト)
- 13:40-14:10 10 カラーFACS 解析システムによるキメリズム解析法
渡辺恵理研究員 (幹細胞治療研究センター 病態解析領域)
- 14:10-14:40 SCID に対する新規造血幹細胞移植法
大津真先生 (幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野)
- 14:40-15:10 肝疾患における末梢血制御性 T 細胞の頻度の検討
高木章乃夫先生 (岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科)
- 15:10-15:40 移植後早期再発症例に対する血縁者間 HLA 半合致移植の検討
清水啓明先生 (済生会前橋病院 血液内科)
- 15:40-16:10 当科での HLA 不適合移植における HLA-Flow 法の役割
藤岡龍哉先生 (兵庫医科大学 血液内科)
- 16:10-16:40 原発性免疫不全症に対する臍帯血移植とキメリズム解析
森尾友宏先生 (東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野、
同・医学部附属病院細胞治療センター)
- 16:40-17:10 臍帯血移植後早期のリンパ球生着動態
松野直史先生 (幹細胞治療研究センター 病態解析領域、虎の門病院 血液内科)
- 17:10-17:20 閉会の挨拶
中内啓光先生 (幹細胞治療研究センター)
- ★ ★ ★ ★ ★
- 17:30-19:30 懇親会 (近代医科学記念館-医科研正門よこ)



【問い合わせ先】

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 病態解析領域 研究会事務局
Phone: 03-5449-5765、Fax: 03-5449-5750、E-mail: nwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

新規 Allele 特異的抗 HLA 抗体の作製を目指した試み

山崎 聡

科学技術振興機構 ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト

Allele 特異的抗 HLA モノクローナル抗体 (ASHmAb) は、その作製が極めて困難であることが知られている。ASHmAb の認識するエピトープは複数の離れたアミノ酸残基が集合して構成される特有の立体構想を有しており、その抗原性はマウス免疫系に認識される異種抗原エピトープと比較して相対的に低いことが原因と考えられる。

近年、我々は迅速かつ効率的に ASHmAb を作製する技術を開発した (Yamazaki *et al.*, 2009)。我々の方法は一般的に知られている方法とは異なり、ヒト HLA トランスジェニックマウスに HLA テトラマータンパク質を免疫することにより、異種抗原エピトープに対する抗体の産生を抑制した。

またハイブリドーマのスクリーニング方法としては、表面に HLA 分子を結合したビーズを用いることにより、ASHmAb の迅速かつ効果的なスクリーニングを可能にした。

また、今回の講演では、ASHmAb の開発に向けた我々の新たな試みもご紹介する。

将来的には、我々が樹立した抗 HLA 抗体は HLA allele の迅速診断に利用できるほか、HLA ミスマッチ造血幹細胞移植の患者におけるキメリズム解析を通じて、生着不全や白血病の再発時における早期診断にも役立つことが期待される。

10 カラーFACS 解析システムによるキメリズム解析法

渡辺恵理

東京大学医科学研究所・幹細胞治療センター・幹細胞治療分野・病態解析領域

造血幹細胞移植後早期の末梢血では、ドナー由来の血液細胞とレシピエント由来の血液細胞が混在する混合キメリズム (mixed chimerism) 状態となる。移植後のレシピエントの体内では、移植片に含まれるドナー由来のエフェクター細胞のアロ免疫反応が誘導され、レシピエント由来の血液細胞を他人の細胞と認識して破壊する。やがて血液細胞は、すべてドナー由来細胞に置き換わり、完全キメリズム (complete chimerism) 状態となる。移植後早期のキメリズム動態は、ドナー由来のエフェクター細胞のアロ免疫反応を反映しており、これを経時的に解析することでレシピエントの病態を観察することができる。すなわち、キメリズム動態は生着不全やGVHD (graft versus host disease)、あるいは再発とも密接に関連しており、キメリズムを解析することは移植後早期に起こる重要な病態の早期診断やメカニズムの解明に役立つと思われる。

我々は、近年増加している臍帯血移植や HLA 半合致移植において HLA がミスマッチであることに着目し、アリル特異的抗 HLA 抗体とフローサイトメーターを使用した新たなキメリズム解析法、HLA-Flow 法を開発した。(Watanabe N, et al. Biol. Blood and Marrow Transplant, 14(6):693-701, 2008)。

平成 21 年度より、我々は HLA-Flow 法の実用化を目指して全国の医療機関と共同で臨床研究を進めている。臍帯血移植の臨床結果から、本法は、1) 移植後早期の生着のモニタリング、2) 移植後早期の遷延するキメリズムの解析、3) 微少残存病変の監視、4) 再発後の腫瘍細胞量の変化、などの病態解析に役立つことが明らかとなった。HLA-Flow 法は迅速、定量的かつ高感度であり、白血球サブセットにおける詳細な解析が可能であるため、従来の XY-FISH 法や STR-PCR 法に比べて非常に有用な情報が得られる。一方で、解析の難しさなどの問題もあり、広く普及するためにはいくつかの課題も残されている。

今回の発表では、HLA-Flow 法の原理、および問題点と対策について述べた後、現在我々が進めている新しい試みを紹介する。

SCID に対する新規造血幹細胞移植法

大津 真

東京大学医科学研究所・幹細胞治療センター・幹細胞治療分野

造血幹細胞移植は、先天性免疫不全症等の難治疾患の根治を目的として行われるが、同種移植における拒絶、生着不全、移植片対宿主病 (GVHD) 等が問題となるため、安全かつ有効な治療法の確立が望まれる。近年、移植技術の進歩に伴い骨髄前処置の軽減が可能になりつつあるが、臓器障害等の毒性を伴う前処置を全く必要とせず、安定したドナーキメリズムを誘導する方法は未だ確立されていない。

私たちは、マウス同種移植モデルにおいてドナーリンパ球を先行投与するのみでアロ反応によりホストの造血ニッチを空にし、後から移植するドナー造血幹細胞の生着と安定なドナーキメリズムを実現する新規移植法 DLIST (Donor Lymphocyte Infusion-based conditioning Stem Cell Transplantation) を確立した。アロ T 細胞による造血ニッチの開放は、ただ一個の造血幹細胞の移植でも生着を可能にし、致死量放射線照射に匹敵する前処置効果を示した。DLIST 法により ~100% のドナーキメリズムを獲得したマウスにおいては、GVH 反応は一過性に収束し、免疫寛容の獲得がみられた。安定キメラマウスは長期生存が可能であり、雌個体においては妊娠出産の能力も保持されていた。

次に、重症複合免疫不全症 (SCID) のモデルとして X 連鎖 SCID (XSCID) マウスにおいて DLIST 法の有効性を検討した。結果、ハプロ一致のアロ T 細胞による前処置のみで、造血幹細胞レベルでのドナー造血への置換が誘導され、リンパ球数および免疫グロブリン値の回復、T 細胞増殖能の改善、胸腺組織の再構築等を伴い、疾患の治療を得ることに成功した。以上より、アロ T 細胞の反応のみにより造血を置換することが可能であり、DLIST 法の有用性を示したが、引き続きヒト細胞を用いたモデル化、今後の展開等についても概説したい。

肝疾患における末梢血制御性T細胞の頻度の検討

高木章乃夫

岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科

高木章乃夫¹⁾、小池和子¹⁾、内海方嗣²⁾、

八木孝仁²⁾、安中哲也¹⁾、三宅康広¹⁾、山本和秀¹⁾

岡山大学大学院消化器・肝臓・感染症内科¹⁾、肝胆膵外科²⁾

【目的】

生体肝移植後において、現在最も問題となっている病態にC型慢性肝炎の再発が挙げられる。その病態は免疫反応による炎症と考えられており、免疫抑制剤・拒絶反応などが複雑に絡み合っていて進行していくと考えられている。肝炎の進展にはウイルス特異的な Cytotoxic T cell (CTL) レスポンスが重要である。移植後においてはこれらウイルス特異的な免疫応答は免疫抑制剤により抑制される可能性があるが移植後においてもさまざまな程度の慢性肝炎を発症する。今回我々は、生体肝移植後を含めた慢性肝疾患患者における末梢血制御性T細胞の分布と病態の関連について検討した。

【方法】

健常成人 (HV) 5 名、非移植C型肝炎患者 (CHC) 4 名、移植後C型肝炎患者 (C-LDLT) 4 名を対象に、末梢血リンパ球を分離し、CD4+CD25+CD127lo の CD4Treg、CD4+CD18+CD49b+ の Tr1、の頻度について検討を行った。

【結果】

各頻度は平均して、HV : CD4Treg-8.91, Tr1-2.35、CHC : CD4Treg-6.49, Tr1-3.38、C-LDLT : CD4Treg-6.8, Tr1-0.577 であった。

【まとめ】

CD4Treg については肝移植後においても大きな違いはなかったが、Tr1 の頻度は移植後において低値をとった。移植後の症例は移植後早期や拒絶疑いの症例が含まれており、病態との関連を含めて発表する。

移植後早期再発症例に対する血縁者間 HLA 半合致移植の検討

清水 啓明

群馬県済生会前橋病院・血液内科（白血病治療センター）

血縁者間 HLA 半合致移植は、ドナーの availability が高く、また強力な GVL 効果が期待できることから難治性造血器腫瘍に対して有望な移植方法である。当院では 2010 年 6 月より、同種移植後早期再発の High Risk 症例に対して血縁者間 HLA 半合致移植を行っている。現在までに行った 5 例に関しての考察と、東京大学医科学研究所に御協力頂いて解析を行った移植後早期のキメリズム推移に関して報告する。

症例 5 例(男 3 例女 2 例、年齢 29~63)は、AML(4 例)または MDS(1 例)の移植後早期再発症例で、全例移植時は非寛解であった。Cell Source は凍結保存した PB を用い、輸注細胞数は $CD34^+$ cell $3.0\sim 4.1\times 10^6/kg$ 、 $CD3^+$ cell $1.4\sim 6.0\times 10^8/kg$ 。前処置は TBI3Gy +Flu30mg/m²×6 +Ara-C2g/m²×4 +Mel70mg/m²×2 +ATG(サイモグロブリン)1mg/kg×2、GVHD 予防は FK+mPSL1mg/kg にて行った。全例 day8~11 の早期に生着が得られた。30~200 日と観察期間は短いものの再発なく生存しており、3 例は初回移植の寛解期間を超えている。

acute GVHD は grade1 を 1 例、grade2 を 2 例に認めたが、いずれもステロイドの増量によって control 可能であった。また SOS/VOD を 1 例に、TMA を 2 例に合併し、いずれも血液透析を必要とする腎不全を発症した。TMA を合併した 2 例は FK506 の中止により軽快し、MMF の内服へと切り替えたが acute GVHD の発症はなかった。ウイルス感染は、3 例で CMV 抗原血症を合併し、1 例で BK virus による重症出血性膀胱炎を合併した。また 1 例が day170 で脳内に多発性の PTLD を発症し、現在全脳照射とリツキサンによる治療中である。

キメリズムの解析は多次元フローサイトメーターを用い、HLA ミスマッチ抗原を指標として行った。解析は移植後 day2 または day5 より 7 日ごとに末梢血の検体で、lineage 別($CD4^+$ T-cell, $CD8^+$ T-cell, B-cell, NK-cell, Monocyte, Granulocyte)に行った。以前報告された CBT との比較では、day2 とごく早期より T-cell がほぼドナー由来になっている点、 $CD4^+$ T-cell の回復に先んじて $CD8^+$ T-cell の回復が認められた点、早期に B-cell の回復が認められた点、Ficoll で分離した単核細胞分画にもかかわらず顆粒球系前駆細胞と思われる分画が多数混在している点が異なっていた。特に前処置に ATG を使用しているにも関わらず、ごく早期に T-cell の回復が見られたのは驚きであった。ドナー由来の T-cell が $CD8$ 優位に回復しているのは allo-reactivity の強さを表していると考えられるが、B-cell や顆粒球前駆細胞に関しては graft 内の細胞の影響も考慮すべきと考えられた。従来の移植方法と比較した血縁者間 HLA 半合致移植の特徴としては、生着が非常に早く、移植後 1 週間以内の早期にキメリズムがドナー由来へと入れ替わった点が挙げられる。最大の不安材料であった重症の acute GVHD の発症は見られず、むしろ BK virus 出血性膀胱炎や PTLD といったウイルス感染症に難渋する例や TMA の合併例があり、ATG の投与量やステロイドの減量方法に関して今後検討が必要と考えられた。抗腫瘍効果は非常に強く、移植後早期再発症例で非寛解での移植であるにもかかわらず、全例で再発を認めていない。また PCR による MRD の解析が可能であった 2 例において、いずれも移植後 4 週の時点で molecular CR となっている。この早期の抗腫瘍効果は、ドナー由来 cytotoxic T-cell の早期の回復が関与している可能性がある。血縁者間 HLA 半合致移植は強い抗腫瘍効果を有し、有望な移植方法と考えられる。GVHD 予防法の至適化や適応症例の拡大など、今後さらに検討を行っていく。

当科での HLA 不適合移植における HLA-Flow 法の役割

藤岡龍哉

兵庫医科大学 血液内科

この十数年の間、我々は HLA 半合致移植を行っており、年々その症例数は増加の一途を辿っている。また、臍帯血移植、そしてミニ移植の発展により HLA 不適合移植の適応の幅は飛躍的に広いものとなった。これらにより HLA 適合ドナーが存在しない患者に対しても造血細胞移植を適応できるようになったことは臨床的意義の大きなところである。一方、これらの移植経過においてはそれまでの従来型の移植では見られることのなかったような複雑な曲面を呈することがしばしばある。ミニ移植後の mixed chimerism の遷延や HLA 不適合移植後の再発時における腫瘍細胞に時に認められる HLA 抗原の消失などが新たな問題として出現してきており、それらに対する解析は臨床上非常に必要度の高い検査手技となっている。

- 前半— 当科で実施の HLA 不適合移植の概要について
- 後半— これらの移植における HLA-flow 法での主な解析例の紹介

原発性免疫不全症に対する臍帯血移植とキメリズム解析

森尾友宏

東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野
同・医学部附属病院細胞治療センター

原発性免疫不全症の多くは10万人に1人程度の稀少疾患であり、その一部では根治的治療法として、造血幹細胞移植が実施される。対象となる疾患としては、

重症複合型免疫不全症（Severe combined immunodeficiency: SCID）、
ウィスコット・アルドリッチ症候群（Wiskott-Aldrich syndrome : WAS）、
X連鎖高IgM症候群（X-linked hyper-IgM syndrome : X-HIM）、
重症好中球減少症（Severe congenital neutropenia : SCN）、
慢性肉芽腫症（Chronic granulomatous disease : CGD）、

などがあげられる。

造血細胞移植の成績は概ね良好（5年生存率70%程度）であるが、生存率には疾患の種類、前処置法、移植前感染症、HLA合致度などが関係している。それぞれの疾患に特有な問題点があるが、共通した問題を解消する方策が模索されている。まず、前処置としては移植に伴う有害事象や長期予後を考え、骨髄非破壊的前処置が選択される傾向にある。また緊急移植が必要な場合や、感染症のコントロール後速やかな移植が必要な場合があり、ドナーとしては、HLA全合致血縁者に加え、臍帯血が選択されることも多い。長期的な免疫能の再構築・維持に関与する因子の抽出も重要である。その評価のための検査法の充実と確立に期待が寄せられている。原発性免疫不全症の移植症例では、Lineageでキメリズムが異なる混合キメラも稀ではなく、それが長期的な免疫能と関係しているとのデータも散見される。HLA-Flow法によるさらなる解析が期待される。

厚生労働省難治性疾患克服事業「原発性免疫不全症に関する調査研究班」では、SCID, WAS, CGDに対する推奨プロトコールを作成しており、全国規模での詳細なデータの集積を試みているが、その中でもキメリズムの動態を解明することは重要な課題の1つである。ここでは最新の原発性免疫不全症候群に対する臍帯血移植成績データを提示し、移植後の体系的免疫学的モニタリング手法や、SCIDへの臍帯血移植におけるHLA-Flow法によるキメリズム解析臨床試験案を紹介する。また、同手法を用いたSCID臍帯血移植後のキメリズム解析結果について報告する。

臍帯血移植後早期のリンパ球生着動態

松野 直史

虎の門病院 血液内科

松野 直史^{1) 2)}, 山本 久史²⁾, 渡辺 信和¹⁾, 谷口 修一²⁾ ら
東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 病態解析領域¹⁾
虎の門病院血液内科²⁾

[緒言] 臍帯血の特徴の1つは、リンパ球の未熟性、すなわち T 細胞のほとんどはナイーブ細胞であることにある。このことは、臍帯血移植後の graft-versus-host (GVH) 反応が軽度である理由の一つと考えられるが、骨髄非破壊的移植法においては残存するレシピエント免疫担当細胞による拒絶の原因ともなりうる。一方で、GVHD 予防を軽減した移植法においては、しばしば生着前早期 (day 9 頃) に発熱、皮疹、下痢等の高サイトカイン血症に起因すると考えられる症状が認められ、臍帯血移植特有のアロ免疫反応の存在が示唆されている。今回、臍帯血移植後早期におけるリンパ球生着動態を詳細に検討し、生着不全や急性 GVHD 等の臨床病態との関連を明らかにすることを目的に、東大医科研と虎の門病院との共同研究を行った。

[対象・方法] 2009年11月から2010年9月までに虎の門病院で施行した臍帯血移植74症例を登録し、移植後14日以内の早期死亡例を除いた68例を解析対象とした。臍帯血移植後1, 2, 3, 4および8週後の末梢血を採取し、単核球分離を行った。HLA-Flow 法による混合キメリズム解析が可能な症例においては、9カラーFACS 解析システムを用いて CD3⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞 (CD3⁺ CD4⁺)、CD8⁺T 細胞 (CD3⁺ CD8⁺)、NK 細胞 (CD3⁻ CD19⁻ CD56⁺)、B 細胞 (CD3⁻ CD19⁺) について、各々の混合キメリズム解析を行った。T 細胞キメリズムが完全ドナータイプとなった時点で、ドナー T 細胞のナイーブ・メモリーフェノタイプを、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞について、それぞれ CD45RA と CCR7 の組み合わせで解析した。

[結果] 68例中、HLA-Flow 法でのキメリズム解析が可能であった41例 (60%) では、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、NK 細胞および B 細胞の回復は、8週目で中央値がそれぞれ 97 (4 - 837), 27 (3 - 1950), 242 (39 - 1247), および 1 (0 - 526) / μ l であり、NK 細胞の増加が顕著であった。CD4⁺, CD8⁺T 細胞, および NK 細胞における1週目のドナーキメリズムは、それぞれ中央値 88.9% (0 - 100), 93.5% (0.1 - 100), および 96.1% (0.7 - 100) であった。生着不全を除く全例で、3週目までにリンパ球各分画での完全ドナーキメリズムを認めた。68例のうち、HLA-Flow 法、STR-PCR 法、あるいは異性間 FISH 法において T 細胞の完全ドナーキメリズムを確認した63例において、ドナー由来 T 細胞のナイーブ・メモリーフェノタイプを解析した。臍帯血移植後2週目において CD4⁺および CD8⁺T 細胞でナイーブフェノタイプはそれぞれ 47.2% (6.0 - 90.2), 11.3% (0.0 - 88.0) であり、CD8⁺T 細胞ではナイーブからメモリーフェノタイプへの変化が顕著であった。

[結語] 虎の門病院における臍帯血移植では、移植後早期にリンパ球のキメリズムスイッチがおこること、またナイーブフェノタイプである臍帯血由来リンパ球は、移植後速やかにメモリーフェノタイプへ変化することが明らかとなった。今後は、これらのリンパ球動態と、臨床病態との関連を解析していく予定である。

キャンパスマップ

構内建物配置図



構内建物名称

地図中 番号	建物名	地図中 番号	建物名	地図中 番号	建物名
①	臨床研究 A 棟	⑧	総合研究棟	⑮	アムジェンホール
②	臨床研究 B 棟	⑨	1 号館	⑯	旧ゲノム解析センター
③	研究棟(別館)(旧 SNPs 棟)	⑩	2 号館	⑰	クレストホール
④	合同ラボ棟	⑪	3 号館	⑱	国際交流会館
⑤	附属病院 C 棟 (旧 MRI 棟)	⑫	4 号館	⑲	看護婦宿舎
⑥	附属病院 B 棟 (診療棟)	⑬	ヒトゲノム解析センター	⑳	白金ホール
⑦	附属病院 A 棟 (新病院棟)	⑭	動物センター	㉑	近代医科学記念館



【問い合わせ先】

東京大学医科学研究所

幹細胞治療研究センター

病態解析領域 研究会事務局

Phone: 03-5449-5765、Fax: 03-5449-5750

E-mail: nwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

